

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP2006/309222

International filing date: 27 April 2006 (27.04.2006)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2005-370756  
Filing date: 22 December 2005 (22.12.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 01 June 2006 (01.06.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2005年12月22日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2005-370756

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

J P 2005-370756

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

出 願 人  
Applicant(s): キヤノン株式会社

2006年 5月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

中 嶋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 0025200-01  
【提出日】 平成17年12月22日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 G01N 33/53  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内  
    【氏名】 山道 淳太  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内  
    【氏名】 尾島 徹則  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000001007  
    【氏名又は名称】 キヤノン株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100123788  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 宮崎 昭夫  
    【電話番号】 03-3585-1882  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100106138  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 石橋 政幸  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100120628  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 岩田 慎一  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100127454  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 緒方 雅昭  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2005-132929  
    【出願日】 平成17年 4月28日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 201087  
    【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0415518

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

支持体と、該支持体の表面に設けられた金属構造体と、を有する標的物質検出素子用の基板であって、

前記金属構造体が、ループ部及び分岐部の少なくとも１つを有することを特徴とする基板。

【請求項 2】

前記金属構造体は、任意に選択した２つの端部間の最大長さ（端部間長）が１０ nm以上１４５０ nm以下の範囲にある請求項 1 に記載の基板。

【請求項 3】

前記２つの端部間の最大長さ（端部間長）が５０ nm以上４５０ nm以下の範囲にある請求項 2 に記載の基板。

【請求項 4】

前記金属構造体の複数を有し、各金属構造体が互いに離間して設けられている請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の基板。

【請求項 5】

隣接する２つのパターン間の距離は、５０ nm以上２０００ nm以下の範囲にある請求項 4 に記載の基板。

【請求項 6】

隣接する２つのパターン間の距離は、１５０ nm以上１０００ nm以下の範囲にある請求項 5 に記載の基板。

【請求項 7】

前記金属構造体は、金、銀、銅及びアルミニウムのいずれかの金属、もしくはそれらの合金からなる請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の基板。

【請求項 8】

前記支持体は、光学的に透明である請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の基板。

【請求項 9】

支持体と、該支持体の表面に設けられた複数の金属構造体と、該金属構造体上に配置された標的物質捕捉体と、を有する標的物質検出素子用の基板であって、

前記金属構造体が、隣接する金属構造体との距離が５０ nm以上２０００ nm以下の範囲内で、前記基板上に規則的に配されていることを特徴とする標的物質検出素子用の基板。

【請求項 10】

前記金属構造体が、開口部を有した膜であり、開口部の形状が二つ以上の帯状の開口部の少なくとも２つが交差した部分の１以上を有する形状である請求項 1 に記載の基板。

【請求項 11】

前記開口部は、任意に選択した２つの端部間の最大長さ（端部間長）が１０ nm以上１４５０ nm以下の範囲にある請求項 10 に記載の基板。

【請求項 12】

前記２つの端部間の最大長さ（端部間長）が５０ nm以上４５０ nm以下の範囲にある請求項 11 に記載の基板。

【請求項 13】

前記開口部の複数を有し、各開口部が互いに離間して設けられている請求項 10 乃至 12 のいずれかに記載の基板。

【請求項 14】

隣接する２つの開口部の距離は、５０ nm以上２０００ nm以下の範囲にある請求項 13 に記載の基板。

【請求項 15】

前記隣接する開口部の距離は、１５０ nm以上１０００ nm以下範囲にある請求項 14 に記載の基板。

【請求項 16】

前記金属構造体は、前記金属構造体の開口部内に、前記金属構造体から空間的に離れて配置されている内部構造体を有する複合金属構造体である請求項10乃至15のいずれかに記載の基板。

【請求項17】

前記金属構造体は、開口部を有した外枠構造体と、少なくとも一部は該外枠構造体の開口内に存在しかつ前記外枠構造体から空間的に離れて配置されている内部構造体と、を有する複合金属構造体である請求項1に記載の基板。

【請求項18】

前記外枠構造体の任意に選択した2つの端部間の最大長さ30nm以上1470nm以下の範囲にある請求項17に記載の基板。

【請求項19】

前記外枠構造体の開口部の任意に選択した2つの端部間の最大長さが20nm以上1460nm以下の範囲にある請求項17に記載の基板。

【請求項20】

請求項1乃至19のいずれか1項に記載の基板の有する金属構造体に標的物質捕捉体を配置してなることを特徴とする標的物質検出用の素子。

【請求項21】

検体中の標的物質を検出するための装置であって、

請求項20に記載の標的物質検出用の素子を保持するための保持手段と、該素子に検体を接触せしめる手段と、該素子による標的物質の捕捉を検出するための検出手段と、を有することを特徴とする標的物質の検出装置。

【請求項22】

前記検出手段が、光学的検出手段である請求項21に記載の検出装置。

【請求項23】

前記光学的手段が、表面プラズモン共鳴法により前記素子に標的物質が捕捉された状態を検出するものである請求項22に記載の検出装置。

【請求項24】

検体中での標的物質の有無または該標的物質の量を検出するための検出方法であって、

請求項20に記載の標的物質検出用の素子と、前記検体とを接触させる工程と、前記検体中に標的物質が含まれている場合における前記素子への標的物質の捕捉を検出する工程と、を有することを特徴とする標的物質の検出方法。

【請求項25】

検体中における標的物質の有無または前記標的物質の量を検出するためのキットであって、請求項41に記載の標的物質検出用の素子と、請求項42乃至47のいずれかに記載の検出装置と、標的物質の前記素子への捕捉に必要な試薬と、を有することを特徴とする標的物質検出用キット。

【請求項26】

検体中における標的物質の有無または前記標的物質の量を検出するためのキットであって、請求項20に記載の標的物質検出用の素子と、標的物質の前記素子への捕捉に必要な試薬と、を有することを特徴とする標的物質検出用キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】標的物質検出用の素子及びそれを作製するための基板、ならびにそれを用いた標的物質の検出方法、検出装置及びキット

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体中における標的物質の有無を検出するために有用な標的物質検出用の素子及びそれを作製するための基板、ならびのこの素子を用いた標的物質検出装置、キット及び検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、金属微粒子を基板表面に固定化し、そこに誘起される表面プラズモン共鳴を利用して金属微粒子近傍の物質を検出する測定法が知られている。金や銀などの金属微粒子に光を入射すると、表面プラズモン共鳴により特徴的な吸光スペクトルが現れる。その共鳴波長は金属微粒子近傍の媒質の誘電率に依存することが知られている。その誘電率が大きくなるに従い、吸光ピークの吸光度は大きくなり、長波長側へシフトするようになる。例えば、特許第3452837号明細書には、直径約20nmの金コロイドを用いた系が開示されている。これは、基板に固定した金属微粒子の直径程度の距離までにある媒質の屈折率を検出するようにしたものであり、その結果、金属微粒子表面への物質の吸着や堆積を検出することができる。また、向井（特開2004-279364号公報）は、同様の測定法に於いて、ポリスチレンなどの透明基板上に微細孔と金属微粒子を設け、光学的な測定に適した素子構成を提案している。

【0003】

更に、特開2005-16963号公報には、開口部を有する金属膜を素子とした、表面プラズモン共鳴法を利用したセンサが開示されている。

【0004】

一方、本発明が応用可能であるバイオセンサは、生体や生体分子の持つ優れた生体分子認識能を利用した計測デバイスであり、近年、医療分野のみならず、環境や食料品等への幅広い応用が期待されている。

【0005】

一般的に、バイオセンサは、測定対象とする物質（以下、標的物質）を認識、捕捉する捕捉体と、その時発生する物理的、化学的な変化を検知し、電気信号、光信号等の検出可能な信号へ変換する検出素子と、から構成される。生体内には、互いに親和性のある物質の組み合わせとして、例えば酵素－基質、抗原－抗体、DNA－DNA等があり、バイオセンサではこれらの組み合わせの一方を基材に固定化もしくは担持し、捕捉体成分として用いることによって、もう一方の物質を選択的に計測できるという原理を利用している。また、検出素子としては、酸素電極、過酸化水素電極、イオン電極、ISFET、サーミスタなど様々な形式のものが提案されており、最近ではナノグラム程度の質量変化が検出できる水晶振動子やSAW素子などが使われる場合もある。

【特許文献1】特許第3452837号明細書

【特許文献2】特開2004-279364号公報

【特許文献3】特開2005-16963号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

表面プラズモン共鳴を利用した測定法は、蛍光色素などの標識分子が必要でないためアッセイの構成が簡単であること、また、金属微粒子表面への吸着反応の過程を直接リアルタイム・モニタリングできること、などの特長を有している。そのため、表面プラズモン共鳴を利用した測定法は、各種のアッセイへの適用が期待されている。しかしながら、これまでの表面プラズモン共鳴を利用して標的物質を検出するための素子を用いて、抗原抗体反応の特異性を利用したイムノ・アッセイなどのアフィニティ・アッセイを行った場合

、十分な検出感度が得られない場合があった。この検出感度に関する課題は、既存の蛍光免疫法や化学発光免疫法に代えて、表面プラズモン共鳴を利用する検出方法をアフィニティ・アッセイに適用する場合における解決すべき課題の一つである。すなわち、上述の検出感度にかかる問題は、表面プラズモン共鳴を利用した測定法の用途拡大への大きな課題である。

#### 【0007】

本発明は、上記の背景技術における課題を鑑みてなされたものであり、その目的は、表面プラズモン共鳴を利用した標的物質の検出感度を向上させる標的物質検出用の素子構成、その構成を用いた標的物質の検出方法、そのための装置、キットを提供することにある。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明の標的物質検出素子用の基板は、支持体と、該支持体の表面に設けられた金属構造体と、を有する標的物質検出素子用の基板であって、

前記金属構造体が、ループ部及び分岐部の少なくとも1つを有することを特徴とする基板である。

#### 【0009】

本発明の標的物質検出用の素子は、上記の基板の有する金属構造体に標的物質捕捉体を配置してなることを特徴とする標的物質検出用の素子である。

#### 【0010】

本発明の標的物質の検出装置は、検体中の標的物質を検出するための装置であって、

上記の標的物質検出用の素子を保持するための保持手段と、該素子に検体を接触せしめる手段と、該素子による標的物質の捕捉を検出するための検出手段と、を有することを特徴とする標的物質の検出装置である。

#### 【0011】

本発明の標的物質の検出方法は、検体中での標的物質の有無または該標的物質の量を検出するための検出方法であって、

上記の標的物質検出用の素子と、前記検体とを接触させる工程と、前記検体中に標的物質が含まれている場合における前記素子への標的物質の捕捉を検出する工程と、を有することを特徴とする標的物質の検出方法である。

#### 【0012】

本発明の標的物質検出用キットは、検体中における標的物質の有無または前記標的物質の量を検出するためのキットであって、上記の標的物質検出用の素子と、上記の検出装置と、標的物質の前記素子への捕捉に必要な試薬と、を有することを特徴とする標的物質検出用キットである。

#### 【0013】

本発明の標的物質検出用キットの他の態様は、検体中における標的物質の有無または前記標的物質の量を検出するためのキットであって、上記の標的物質検出用の素子と、標的物質の前記素子への捕捉に必要な試薬と、を有することを特徴とする標的物質検出用キットである。

#### 【発明の効果】

#### 【0014】

本発明によれば、局在プラズモン共鳴を利用した標的物質の検出に用いる標的物質検出用の素子における基板上に設けた局在プラズモン共鳴発生用の金属構造体の形状及び配置を工夫するという構成変更によって標的物質の検出感度を向上させることが可能となる。

#### 【0015】

また、金属膜中に分岐部を有する開口を設けた基板を用いた標的物質検出素子でも、支持体上に設けた表面プラズモン共鳴発生用の金属膜の開口部の形状及び配置を工夫したこととで標的物質の検出感度を向上させることが可能となる。

#### 【0016】

すなわち、金属膜の開口部は、二つ以上の帯状の開口部が交差した形状である。この素子の形状においては単純な四角形の形状と比較し、開口部形状の輪郭長さの増大、角部の数が増加することとなり、表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサの検出感度の向上の要因となり得る。

#### 【0017】

外枠構造体内に内部構造体を設けた基板を用いた標的物質検出用の素子においても、同様である。すなわち、表面プラズモン共鳴を利用した標的物質の検出に用いる標的物質検出用の素子における支持体上の設けた表面プラズモン共鳴発生用の開口部を有する外枠構造体、及び内部構造体の形状及び配置工夫することで標的物質の検出感度を向上させることが可能となる。この素子の形状においては開口部を有する外枠構造体が形成する電場と、その開口部内に存在する内部構造体が形成する電場が相互作用により表面プラズモン共鳴による吸収ピーク波長、吸収強度、素子周辺的环境変化による応答性が変化する。この相互作用を最適化することより表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサの検出感度の向上の要因となり得る。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0018】

以下、本発明に含まれる各態様について詳細に説明する。

（標的物質検出用の素子）

（第1の形態）

この形態にかかる標的物質検出用の素子（検出素子）は、支持体と、支持体の表面に設けられた局在プラズモン共鳴発生用の金属構造体と、金属構造体に設けられた標的物質の捕捉体と、を少なくとも有して構成される。支持体と金属構造体とを有し、標的物質の捕捉体を固定していない状態のものは、標的物質検出用素子を作製するための基板として提供することができる。

#### 【0019】

本発明の素子では、金属構造体の配置の最適化と金属構造体の平面形状（金属パターン）を特定の形状としたことで標的物質の検出感度を向上させるものである。なお、金属構造体の平面形状とは、基板面（支持体面）と平行な面における金属構造体の形状をいい、基板表面を上方から見たときの平面図における形状をいう。

#### 【0020】

本発明では、金属構造体の平面形状は、ループ部と分岐部の少なくとも1つを有する。金属構造体（金属構造体）の一例を、図1（A）～（E）及び図2（A）～（F）にそれぞれ示す。図1には、多角形あるいは円形をなすループ部（周回構造）を主体として構成されたものが、図2には、分岐部を主体として構成されたものが示されている。

#### 【0021】

ループ部を有する金属構造体の平面形状としては、図1（A）～（C）に示すようなループ部のみからなるリング状や、図1（D）のように、その一部分にループ部を有する形状を挙げることができる。更に、図1（E）のようにリングの内側の形状が外側の形状と異なる形状でもよい。また、同一金属構造体に2以上のループを結合したパターンとすることもできる。

#### 【0022】

分岐部を有する金属構造体の平面形状としては、図2（A）及び（B）に示すように、少なくとも2本の帯状部により交差部が形成された形状、図2（C）乃至（E）にあるように、交差部において帯状部の少なくとも1つが交差部で封止されて、他方の側へ突き抜けていない形状などを挙げることができる。更に、図2（F）のように、製法上、交差部の角が鋭角に形成されずに、丸く鈍ったような形状を形成していてもよい。また、帯状部の交差する角度は、直角に限定されない。更に、図2に示す例では、帯状部は直線的に伸びているが、帯状部は曲線的に伸びているものであってもよい。

#### 【0023】

金属構造体の形成に用いる材料としては、金、銀、銅及びアルミニウムのいずれかの金



属、もしくはそれらの合金を用いることができる。金属構造体は、支持体との密着性の観点から、支持体との間にクロムあるいはチタンなどの薄膜を介して、支持体上に形成されていてもよい。

#### 【0024】

金属構造体は、10 nmから100 nm程度の膜厚で形成される。

#### 【0025】

金属構造体の平面形状における大きさ、すなわち、外周部における任意の一点から他の点までの距離は、10 nm～1450 nmの範囲内にあることが好ましい。更には、50 nm～450 nmの範囲内にあることが好ましい。この場合、任意の2点間の最大距離がこの範囲に入っていればよい、例えば、図18に示す井桁状のパターンの場合では点XY間の距離が最大であるので、この距離を上記の範囲内とする。また、同様に矩形リングパターンの場合でも外周形状のXY間の対角線Lの距離が最大であるのでLを上記の範囲内とする。図1(C)に示す円形リングパターンでは、外周円の直径を上記の範囲とする。金属構造体の平面形状の大きさがこの範囲にあることで、目的とする検出感度を達成できる局在プラズモン共鳴を更に効果的に得ることができる。

#### 【0026】

一方、金属構造体は帯状の部分の基本として構成されており、この帯状部分の幅（帯幅）は、金属構造体の形成が可能であり、かつ本発明が目的とする局在プラズモン共鳴が得られるものであれば特に限定されない。帯幅は、10 nm～100 nmの範囲とすることが好ましい。この帯幅は、例えば図1(C)の円形リングパターンの場合は、外周円と内周円の半径の差であり、図18に示すパターンの場合はWで示される部分である。また、帯状のパターンの幅は同一金属構造体中で同一であっても、帯幅に異なる部分があってもよい。

#### 【0027】

金属構造体は、必要に応じて支持体上に1個以上を設ける。複数個設ける場合には、各金属構造体の間隔は、好ましくは50 nm～2000 nm、より好ましくは150 nm～1000 nmの範囲から選択した距離とすることが好ましい。これは、金属構造体同士のプラズモンによる相互作用により空間的な電場の分布・強度に影響があるためである。また、間隔が大きくなると、金属構造体の密度が下がり、信号強度が弱くなってしまうため、特殊な光学系を適用する必要性が出てくるので、上記範囲にあることが好ましい。

#### 【0028】

複数の金属構造体を設ける場合は、平面形状及びその大きさの少なくとも1つにおいて異なる複数種類の金属構造体を支持体上に設けることができる。金属構造体の製造効率や検出系の構成を簡便化する点などを考慮した場合は、図3及び4に示すように、数mm角程度の領域に同一形状及び大きさの金属構造体を規則的にアレイ状に支持体上に配置することが好ましい。このような配置とすることで、透過光や散乱光、反射光の測定を容易にすることができる。

#### 【0029】

金属構造体の膜厚、外形、帯幅、構造体間隔は、局在プラズモン共鳴スペクトルのピーク位置に影響するため、測定に適したサイズに形成するものとする。金属構造体の平面形状をループ部及び／または分岐部を有するものとするることによる検出感度の向上は、1つの金属構造体における輪郭長さが増大すること、分岐部を利用する場合には更に角部の数が増加すること、金属構造体の平面形状におけるエッジ間の距離を小さくできること、などが相乗的に関与しているものと考えられる。例えば、図1(A)～(C)で示される形状における中抜き部分（白地部）がない場合には、金属構造体の輪郭長は外周部分のみとなる。これに対して、図1(A)～(C)におけるように中抜き部分を有することで、金属構造体の輪郭長は、外周部と内周部の2つの合計となり、輪郭長が増加する。更に、図1(A)の場合では、角部は合計8個であり、中抜き部分がない場合の4の2倍となる。また、図1(A)の場合において中抜き部分Hがない場合は、外周を形成するエッジ部E1上での2点間の距離（エッジ間距離）は正方形の対峙する2辺の間隔となる場合に最小

となるのに対して、中抜き部分Hがある場合にはエッジ間距離は外周エッジE 1と内周エッジE 2の間での最大距離pとなり、同一の大きさの金属構造体内でエッジ間距離を短縮することができる。

#### 【0030】

図1(C)で示されるリング形状の場合では、輪郭長が外周部と内周部との合計となり、エッジ部の表面プラズモンの増強領域が拡大され、更に、リングの内側と外側のエッジが近接するので表面プラズモン同士が相互作用し表面プラズモンが更に大きく増強されるという効果が期待できる。

#### 【0031】

一方、図2(D)に示す分岐部を有するH型金属構造体でも、同じ外形サイズを有するが、分岐部を持たない正方形(中抜き部なし)の形状に比べ、輪郭長が増大し、かつエッジ間距離も近くなる。更に、角部の個数も正方形の4に対して12と増大する。かかる形状に基づく金属構造体の構造は、表面プラズモンの増強領域が大きくなり、実効的な検出領域の割合が増大する、また、角部や交差部では近接する表面プラズモン同士が相互作用し表面プラズモンが大きく増強されるなどの特徴を有する。

#### 【0032】

なお、本発明者らは、 $100\text{ nm} \times 100\text{ nm}$ のサイズの正方形のパターンを金属のエッジ部が増えるようにみじん切りにして、各 $10\text{ nm} \times 10\text{ nm}$ の断片に細分化して配置したもので、本発明において目的とする検出感度の増強効果が得られにくいことを確認している。

#### 【0033】

金属構造体を形成するための支持体としては、光学的に透明な、ガラス板、石英板、ポリカーボネートやポリスチレンなどの樹脂板やITO基板などを用いることができる。すなわち、プラズモン共鳴法による検出を可能とする支持体であればよい。

#### 【0034】

この形態にかかる標的物質検出用素子は、支持体の所定位置に金属構造体を形成し、更に、金属構造体上に捕捉体を配置することにより得ることができる。その製造方法の一例を図5に示す。図5に示したように、まず、支持体1上に金属薄膜2をスパッタ法あるいは蒸着法により成膜する(図5(B))。その上に電子線レジスト3をスピンコートにより成膜し(図5(C))、電子線描画装置で露光し、現像後レジストパターンを得る(図5(D))。その後、不要な金属薄膜をエッチングし(図5(E))、レジストを除去して、アレイ状に配置した金属構造体4を形成する(図5(F))。電子線描画装置の他、集束イオンビーム加工装置、X線露光装置、EUV露光装置によるパターンニングで作製することもできる。

#### 【0035】

また、図6に示したように、モールド法により作製した微細な凹凸の支持体1(図5(A))を用いた作製方法も可能である。この場合、支持体1上に金属薄膜2をスパッタ法あるいは蒸着法により成膜する(図6(B))。次に表面の金属膜を研磨し、所望の金属構造体を支持体上に形成する(図6(C))。同様に図7は、金属薄膜2が支持体1の凹凸よりも薄い場合の作製方法を示すものである。この場合、支持体1の凸部が金属薄膜3表面より上部にあってもよいし、凹凸部の壁面に金属薄膜3が成膜されていてもよい。ここで、研磨する代わりに金属膜をドライエッチングによるエッチバックを利用して除去することも可能である。

#### 【0036】

素子への標的物質捕捉能の付与には、図8にあるように抗体5などの化学物質を標的物質6の捕捉体として用いるのが好ましい。抗体を金属構造体上に固定すると、金属構造体上に標的物質が近づくと特異的に複合体を形成し、素子表面における誘電率(屈折率)を変化させる。抗体の他には、このような複合体形成の他の例としては、酵素と基質の複合体、DNAのハイブリダイゼーションによる相補的な塩基対形成などが挙げられ、これらの複合体の一方を他方の捕捉体として利用することができる。これらの捕捉体は、物理的

あるいは化学的な方法により、検出素子の表面に固定化される。また、素子の表面は、いわゆる非特異吸着による共雑物の吸着によるシグナルを防止するために、スキムミルクやカゼイン、ウシ血清アルブミン、リン脂質、ポリエチレングリコール及びそれらの誘導体などによるコーティングを行うと、なお好適である。

#### 【0037】

(第2の形態)

以下第1の形態の変形例である第2の形態について説明する。第2の形態の基板は、支持体と、該支持体の表面に設けられた金属膜で構成される標的物質検出用素子であって、前記金属膜が、開口部を有した膜であり、開口部の形状が二つ以上の帯状の開口部の少なくとも2つが交差した部分の1以上を有する形状であることを特徴とする検体中の標的物質検出素子用の基板である。この基板の金属膜に標的物質捕捉体を固定することで標的物質検出素子を得ることができる。

#### 【0038】

この素子は、金属膜の開口部の配置の最適化と開口部の平面形状(金属パターン)を特定の形状としたことで標的物質の検出感度を向上させるものである。なお、開口部の平面形状とは、基板面(支持体)と平行な面における開口部の形状をいい、基板表面を上方から見たときの平面図における形状をいう。

#### 【0039】

この形態の金属膜の開口部の平面形状は、二つ以上の帯状の開口部が交差した形状を有する。金属膜(開口部形状)の一例を、図19(A)～(F)にそれぞれ示す。金属膜の開口部の平面形状としては、図19(A)及び(B)に示すように、少なくとも2本の帯部により交差部が形成された形状を挙げることができる。更に、図19(C)乃至(E)にあるように、交差部において帯状部の少なくとも1つが交差部で封止されて、他方の側へ突き抜けていない形状などを挙げることができる。更に、図19(F)のように、製法上、交差部の角が鋭角に形成されずに、丸く鈍ったような形状を形成していてもよい。また、帯状部の交差する角度は、直角に限定されない。更に、図19に示す例では、帯状部は直線的に伸びているが、帯状部は曲線的に伸びているものであってもよい。

#### 【0040】

金属膜の形成に用いる材料としては、金、銀、銅及びアルミニウムのいずれかの金属、もしくはそれらの合金を用いることができる。金属膜は、支持体との密着性の観点から、支持体との間にクロムあるいはチタンなどの薄膜を介して、支持体上に形成されていてもよい。

#### 【0041】

金属膜は、10nmから100nm程度の膜厚で形成される。

#### 【0042】

金属膜の開口部の任意に選択した二つの端部間の最大長さ(端部間長)とは、平面形状における大きさである。すなわち、外周部における任意の一点から他の点までの距離であり、10nm～1450nmの範囲内にあることがより好ましい。更には、50nm～450nmの範囲内にあることがより好ましい。この場合、任意の2点間の最大距離がこの範囲に入っていればよい、例えば、図24に示すパターンの場合では点XY間の距離が最大であるので、この距離を上記の範囲内とする。開口部の平面形状の大きさがこの範囲にあることで、目的とする検出感度を達成できる表面プラズモン共鳴を更に効果的に得ることができる。

#### 【0043】

一方、金属膜の開口部は帯状の部分の基本として構成されており、この帯状部分の幅(帯幅)は、開口部の形成が可能であり、かつ本発明が目的とする表面プラズモン共鳴が得られるものであれば特に限定されない。帯幅は、10nm～100nmの範囲とすると簡便に測定が可能な吸収スペクトルの強度があり、より好ましい。また、帯状のパターンの幅は同一開口部中で同一であっても、帯幅に異なる部分があってもよい。

#### 【0044】

金属膜の開口部は、必要に応じて支持体上に1個以上を設ける。複数個設ける場合には、各開口部の間隔は、好ましくは50 nm～2000 nm、より好ましくは150 nm～1000 nmの範囲から選択した距離とすることが好ましい。これは、開口部の表面プラズモンによる相互作用により空間的な電場の分布・強度に影響があるためである。また、間隔が大きくなると、開口部の面積が下がり、信号強度が弱くなってしまうため、特殊な光学系を適用する必要性が出てくるので、上記範囲にあることが好ましい。

#### 【0045】

金属膜上に複数の開口部を設ける場合は、平面形状及びその大きさの少なくとも1つにおいて異なる複数種類の開口部を金属膜上に設けることができる。金属膜の製造効率や検出系の構成を簡便化する点などを考慮した場合は、図20に示すように、数mm角程度の領域に同一形状及び大きさの開口部を規則的に支持体上に配置することが好ましい。このような配置とすることで、透過光や散乱光、反射光の測定を容易にすることができる。

#### 【0046】

金属膜の膜厚、開口部の外形、開口部の帯幅、開口部間隔は、表面プラズモン吸光スペクトルのピーク位置に影響するため、測定に適したサイズに形成するものとする。開口部の平面形状を二つ以上の帯状の開口部が交差した形状とすることによる検出感度の向上は、1つの開口部における輪郭長さが増大すること、更に角部の数が増加することによる。

#### 【0047】

一方、図19(D)に示す分岐部を有するH型開口部でも、同じ外形サイズを有するが、分岐部を持たない正方形(中抜き部なし)の形状に比べ、輪郭長が増大し、かつエッジ間距離も近くなる。更に、角部の個数も正方形の4に対して12と増大する。かかる形状に基づく開口部の構造は、表面プラズモンの増強領域が大きくなり、実効的な検出領域の割合が増大する、また、角部や交差部では近接する表面プラズモン同士が相互作用し表面プラズモンが大きく増強されるなどの特徴を有する。

#### 【0048】

金属膜を形成するための支持体としては、光学的に透明な、ガラス板、石英板、ポリカーボネートやポリスチレンなどの樹脂板やITO基板などを用いることができる。すなわち、表面プラズモン共鳴法による検出を可能とする支持体であればよい。

#### 【0049】

この形態にかかる標的物質検出用素子は、支持体の所定位置に金属膜の開口部を形成し、更に、金属膜に捕捉体を配置することにより得ることができる。その製造方法の一例を図21に示す。図21に示したように、まず、支持体1上に金属薄膜2をスパッタ法あるいは蒸着法により成膜する(図21(B))。その上に電子線レジスト3をスピンコートにより成膜し(図21(C))、電子線描画装置で露光し、現像後レジストパターンを得る(図21(D))。その後、不要な金属薄膜をエッチングし(図21(E))、レジストを除去して、アレイ状に配置した開口部3を形成する(図21(F))。電子線描画装置の他、集束イオンビーム加工装置、X線露光装置、EUV露光装置、エキシマ光露光装置によるパターンニングで作製することもできる。

#### 【0050】

素子への標的物質捕捉能の付与には、図22にあるように抗体5などの化学物質を標的物質6の捕捉体として用いるのが好ましい。抗体を金属膜上に固定すると、金属膜上に標的物質が近づくと特異的に複合体を形成し、素子表面における誘電率(屈折率)を変化させる。抗体の他には、このような複合体形成の他の例としては、酵素と基質の複合体、DNAのハイブリダイゼーションによる相補的な塩基対形成などが挙げられ、これらの複合体の一方を他方の捕捉体として利用することができる。これらの捕捉体は、物理的あるいは化学的な方法により、検出素子の表面に固定化される。また、素子の表面は、いわゆる非特異吸着による共雑物の吸着によるシグナルを防止するために、スキムミルクやカゼイン、ウシ血清アルブミン、リン脂質、ポリエチレングリコール及びそれらの誘導体などによるコーティングを行うと、なお好適である。本形態の基板は、開口部の形状が二つの以上の帯状の開口部の少なくとも2つが交差した部分の1以上を有する形状を有している。

ここでは説明していないが、開口がループ部を有するものも本願発明思想の範囲内に包含される。即ち、図20に示される交差部分を有する開口の代わりにループ部を有する開口を採用したものも本願発明は包含する。

#### 【0051】

##### (第3の形態)

以下第2の形態の変形例である第3の形態について説明する。第3の形態の基板は、支持体と、該支持体の表面に設けられた複合金属構造体で構成される標的物質検出用素子であって、前記複合金属構造体は、開口部を有した枠体構造体と、少なくとも一部は該枠体構造体の開口内に存在しかつ開口部を有し、前記枠体構造体から空間的に離れて配置されている内部構造体と、を有することを特徴とする検体中の標的物質検出素子用の基板である。この基板の金属膜に標的物質捕捉体を固定することで標的物質検出素子を得ることができる。

#### 【0052】

この素子(検出素子)は、支持体と、支持体の表面に設けられた表面プラズモン共鳴発生用の複合金属構造体と、を少なくとも有して構成される。この素子では、複合金属構造体の配置の最適化と、複合金属構造体の平面形状(金属パターン)を特定の形状としたことで標的物質の検出感度を向上させるものである。なお、複合金属構造体の平面形状とは、基板面(支持体面)と平行な面における複合金属構造体の形状をいい、基板表面を上方から見たときの平面図における形状をいう。

#### 【0053】

金属パターン(複合構造体)は、開口部を有する枠構造としての外枠構造体(以下、小金属構造体という)と、その開口部内部に少なくとも一部が位置する内部構造体(以下、微小金属構造体)が存在する形状を有する。金属パターンは小金属構造体の外形と、小金属構造体の開口部の形状と、微小金属構造体の形状より構成される。

#### 【0054】

金属パターンの構成要素の一つである、小金属構造体の外形のみ変化させた一例を図25(A)～(F)に示す。

#### 【0055】

小金属構造体の外形パターンには、図25(A)のような膜平面形状、図25(B)及び(C)のような多角形状、図25(D)のような円あるいは楕円といった曲面を持つ形状、図26(E)及び(F)のような図1(B)～(D)を組み合わせた形状がある。製法上、交差部の角が鋭角に形成されずに、丸く鈍ったような形状を形成していてもよい。また、交差する角度は、直角に限定されない。

#### 【0056】

金属パターンの構成要素の一つである、小金属構造体の開口部の形状のみ変化させた一例を図26(A)～(F)に示す。

#### 【0057】

小金属構造体の開口部パターンとしては、図26(A)、(B)及び(C)のような多角形状、図26(D)のような円あるいは楕円といった曲面をもった形状、図26(E)及び(F)のような図26(B)～(D)を組み合わせた形状がある。製法上、交差部の角が鋭角に形成されずに、丸く鈍ったような形状を形成していてもよい。また、交差する角度は、直角に限定されない。

#### 【0058】

金属パターンの構成要素の一つである、小金属構造体の開口部の形状のみ変化させた一例を図27(A)～(F)に示す。

#### 【0059】

微小金属構造体の形状パターンには、図27(A)および(B)のような多角形状、図3(C)のような円あるいは楕円といった曲面をもった形状がある。更には、図27(D)及び(E)のような図27(A)～(C)を組み合わせた形状、図27(F)のような開口部を持つ小金属構造体と同様な形状がある。製法上、交差部の角が鋭角に形成されずに、丸

く鈍ったような形状を形成していてもよい。また、交差する角度は、直角に限定されない。

#### 【0060】

複合金属構造体の形状パターンは図25～図27を組み合わせて構成されており、その一例を図28(A)～(F)に示す。

#### 【0061】

複合金属構造体の形状パターンとしては、図28(A)のような多角形の外形に多角形の開口部の小金属構造体と、多角形の微小金属構造体から構成される形状、図28(B)のような微小構造体の開口部内部にさらに構造体がある形状がある。更には、図28(C)のような外形、開口部、微小構造体がそれぞれ異なった形状を組み合わせた形状、図28(D)のような一つの開口部に複数の微小構造体が存在する形状がある。更には、図28(E)のような微小構造体に複数の開口部が存在する形状、図28(F)のような一つの開口部に異なる微小構造体が存在する形状がある。製法上、交差部の角が鋭角に形成されずに、丸く鈍ったような形状を形成していてもよい。また、交差する角度は、直角に限定されない。

#### 【0062】

複合金属構造体の形成に用いる材料としては、金、銀、銅及びアルミニウムのいずれかの金属、もしくはそれらの合金を用いることができる。また、小金属構造体及び各微小金属構造体はそれぞれ異なっているとしてもよい。複合金属構造体は、支持体との密着性の観点から、支持体との間にクロムあるいはチタンなどの薄膜を介して、支持体上に形成されていてもよい。

#### 【0063】

複合金属構造体は、10nmから100nm程度の膜厚で形成される。小金属構造体及び微小金属構造体はそれぞれ膜厚が異なっているとしてもよい。

小金属構造体と微小金属構造体は水平方向から見たとき、図29のように小金属構造体開口空間内に微小金属構造体が少なくとも一部は存在する、もしくは接している。また小金属構造体および微小金属構造体の形状は図29のように直方体のみではなく、曲面や直方体を組み合わせた構造体でもよい。

#### 【0064】

図29に示した形態の標的物質検出用素子は、支持体の所定位置に金属構造体を形成し、更に、金属構造体上に捕捉体を配置することにより得ることができる。その製造方法の一例を図32に示す。図32に示したように、まず、支持体1上に電子線レジスト3をスピンコートにより成膜し(図32(B))、電子線描画装置で露光し、現像後レジストパターンを得る(図32(C))。その後、支持体をエッチングし(図32(D))、レジストを除去して、凹凸を持つ支持体を形成する(図32(E))。凹凸を持つ支持体の上に金属薄膜2をスパッタ法あるいは蒸着法により成膜する(図32(F))。その上に電子線レジスト3をスピンコートにより成膜し(図32(G))、電子線描画装置で露光し、現像後レジストパターンを得る(図32(H))。その後、不要な金属薄膜をエッチングし(図32(I))、レジストを除去して、アレイ状に配置した金属構造体を形成する(図32(J))。電子線描画装置の他、集束イオンビーム加工装置、X線露光装置、EUV露光装置によるパターンニングで作製することもできる。

#### 【0065】

小金属構造体の外形、開口部、及び微小金属構造体の任意に選択した二つの端部間の最大長さ(端部間長)とは、平面形状における大きさである。すなわち、外周部における任意の一点から他の点までの距離であり、任意の2点間の最大距離が指定の範囲に入っていればよい、例えば、図24に示すパターンの場合では点XY間の距離が最大であるので、各構造体において、この距離を指定範囲内とする。各構造体の平面形状の大きさがこの範囲にあることで、目的とする検出感度を達成できる表面プラズモン共鳴を更に効果的に得ることができる。

#### 【0066】

複合金属構造体は、必要に応じて支持体上に1個以上を設ける。複数個設ける場合には、各複合金属構造体の間隔は、好ましくは50nm～2000nm、より好ましくは150nm～1000nmの範囲から選択した距離とすることが好ましい。これは、複合金属構造体の表面プラズモンによる相互作用により空間的な電場の分布・強度に影響があるためである。また、間隔が大きくなると、金属の面積が下がり、信号強度が弱くなってしまうため、特殊な光学系を適用する必要性が出てくるので、上記範囲にあることが好ましい。

#### 【0067】

支持体に複数の複合金属構造体を設ける場合は、平面形状及びその大きさの少なくとも1つにおいて異なる複数種類の複合金属構造体を支持体上に設けることができる。複合金属構造体の製造効率や検出系の構成を簡便化する点などを考慮した場合は、図7に示すように、数mm角程度の領域に同一形状及び大きさの複合金属構造体を規則的に支持体上に配置することが好ましい。このような配置とすることで、透過光や散乱光、反射光の測定を容易にすることができる。

#### 【0068】

複合金属構造体を構成する、小金属構造体及び微小金属構造体は、表面プラズモン吸光スペクトルのピーク位置に影響するため、測定に適したサイズに形成し、配置する。小金属構造体と微小金属構造体を組み合わせたことによる検出感度の向上は、小金属構造体開口空間に配置された微小金属構造体が相互作用を起こすことによる。

#### 【0069】

複合金属構造体を形成するための支持体としては、光学的に透明な、ガラス板、石英板、ポリカーボネートやポリスチレンなどの樹脂板やITO基板などを用いることができる。すなわち、表面プラズモン共鳴法による検出を可能とする支持体であればよい。

#### 【0070】

この形態にかかる標的物質検出用素子は、支持体の所定位置に複合金属構造体を形成し、更に、複合金属構造体に捕捉体を配置することにより得ることができる。その製造方法の一例を図21に示す。図21に示したように、まず、支持体1上に金属薄膜2をスパッタ法あるいは蒸着法により成膜する(図21(B))。その上に電子線レジスト3をスピコートにより成膜し(図21(C))、電子線描画装置で露光し、現像後レジストパターンを得る(図21(D))。その後、不要な金属薄膜をエッチングし(図21(E))、レジストを除去して、アレイ状に配置した複合金属構造体3を形成する(図21(F))。電子線描画装置の他、集束イオンビーム加工装置、X線露光装置、EUV露光装置、エキシマ光露光装置によるパターンニングで作製することもできる。

#### 【0071】

素子への標的物質捕捉能の付与には、図22にあるように抗体5などの化学物質を標的物質6の捕捉体として用いるのが好ましい。抗体を複合金属構造体に固定すると、複合金属構造体上に標的物質が近づくと特異的に複合体を形成し、素子表面における誘電率(屈折率)を変化させる。抗体の他には、このような複合体形成の他の例としては、酵素と基質の複合体、DNAのハイブリダイゼーションによる相補的な塩基対形成などが挙げられ、これらの複合体の一方を他方の捕捉体として利用することができる。これらの捕捉体は、物理的あるいは化学的な方法により、検出素子の表面に固定化される。また、素子の表面は、いわゆる非特異吸着による共雑物の吸着によるシグナルを防止するために、スキムミルクやカゼイン、ウシ血清アルブミン、リン脂質、ポリエチレングリコール及びそれらの誘導体などによるコーティングを行うと、なお好適である。

#### 【0072】

(検出装置及び検出方法)

次に、上記の構成の素子を用いた標的物質検出装置について説明する。本発明による検出装置は、上記構成の素子を保持する保持手段と、素子からの信号を検出するための検出手段と、を少なくとも有して構成される。

#### 【0073】



検出手段としては、光源と分光器、レンズ類から構成される光学検出系と、検体を素子まで移動させ素子との反応を起こさせるための反応領域を形成するための反应用ウェル、流路、送液機構等からなる送液系を有するものが好適に利用できる。光源としては、可視領域から近赤外領域までの波長領域をカバーできるものを用いることができる。光学測定は、吸収スペクトル、透過スペクトル、散乱スペクトル、反射スペクトルを用いることができる。最も好ましくは、吸収スペクトルのピーク波長あるいは、ピークの吸収強度を利用する。素子の有する金属構造体上に設けた捕捉体に標的物質が特異的に結合すると、局在プラズモン共鳴が非結合状態に対して変化し、吸収スペクトルのピーク波長は、長波長側にシフトし、吸収強度は増大する。そのシフト量の程度によって、あらかじめ作製しておいた標的物質に対する検量線から標的物質の量を定量することができる。この素子は、局在プラズモン共鳴を利用しているので、金属構造体近傍では、局所的な電場増強が起こる。この現象は、表面増強ラマン分光法（SERS）や表面プラズモン蛍光分光法（SPFS）などの測定法にも応用でき、これらの方法による標的物質の定量も可能である。

#### 【0074】

標的物質検出素子は、表面プラズモン共鳴を利用して標的物質の検出を行い、金属構造体近傍では、局所的な電場増強が起こる。この現象は、表面増強ラマン分光法（SERS）や表面プラズモン蛍光分光法（SPFS）などの測定法にも応用でき、これらの方法による標的物質の定量も可能である。

反応領域とは、素子と検体を接触させるための領域である。その反応により、検体中に含まれる標的物質が素子と接触して、標的物質の検出を可能にする。

#### 【0075】

反应用ウェルや流路は、いわゆるμTAS（Micro Total Analysis System）型の装置で用いられているポリジメチルシロキサン（PDMS）基板によって、作製されるのが容易である。このPDMS基板を、検出素子を作製してある基板と貼りあわせて図5のような形状にて使用するものとする。送液機構としては、マイクロピストンポンプやシリンジポンプなどを用いる。次に、代表的な装置形態を図9及び図10に示す。まず、素子18の保持手段と反応領域形成手段を兼ねる反応ウェル部7に素子18を配置され、インレット、アウトレットを有した検出チップ22（点線内部）を送液ポンプ、廃液リザーバに接続する。標的物質を含む検体を流路11を介して送液ポンプ10でインレット8より導入する。一定時間のインキュベーションを行い、その時の光源ユニット12より光を反応ウェル部7を透過させ、透過スペクトルを分光光度計13により測定する。中央演算装置14にて、あらかじめ作製してある検量用データと比較し、濃度などの測定結果を表示ユニット15に表示する。必要があれば、測定前にリン酸緩衝液などを洗浄液としてインレット8より導入し、反応ウェル部7を洗浄してもよい。ここで、一定時間後のスペクトル変化を静的に測定する他に、その変化を動的にリアルタイム測定することも可能である。その場合、時間変化率などを新たな情報として取得することができる。以上の操作を入力ユニット19より入力し、あらかじめHDD20に記録しておいたプログラムをRAM21にロードし、操作を実行する。

#### 【0076】

##### （検出用キット）

上記構成の素子と、標的物質の素子への捕捉に必要な試薬あるいは、上記構成の素子と、上記構成の検出装置と、標的物質の素子への捕捉に必要な試薬と、を少なくとも用いて標的物質検出用キットを構成することができる。

#### 【0077】

捕捉する標的物質としては、生体物質（タンパク質、核酸、糖鎖、脂質等）やアレルギー、バクテリア、ウイルス等が好適である。さらに、検出装置は生体由来の物質又はその類似物質を捕捉体成分として用いた、いわゆるバイオセンサに医療用、産業用、家庭用を問わず、好適に応用できる。これにより、検体中の微量の標的物質を検出することができる。

#### 【実施例】



#### 【0078】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。なお、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

#### 【0079】

##### （実施例1）

図11に本実施例で用いた検出装置の概略の構造を示す。検出素子4は、膜厚20nmの金薄膜を625 $\mu$ m厚の石英板上に形成し、これを所定のパターンに電子線描画装置を用いてパターンニングすることで製作した。図12の走査型電子顕微鏡（SEM）画像にあるように、金属構造体の平面形状の外形は160nm $\times$ 160nmの正形状、リングの帯幅は70nmである。解像性の高低により、内側の開口部の形状は、外形とは必ずしも同じに作製できるとは限らない。各パターンは、250nmのスペースを開けてアレイ状に3mm $\times$ 3mmの領域に配置されている。本実施例の構造体の吸収スペクトルは、800nm近傍にピーク波長を持っている。

#### 【0080】

次に、金属構造体の表面に捕捉能を付与するため、本実施例で用いる標的物質捕捉体である抗AFP（ $\alpha$ -fetoprotein）抗体を金の構造体表面に固定する方法を示す。本実施例の構造体の材質である金と親和性の高いチオール基を持つ、11-Mercapto undecanoic acidのエタノール溶液をスポッタ等で素子上に滴下し、前記構造体表面を修飾する。これにより、構造体表面にカルボキシル基が露出される。その状態で、N-Hydroxysulfosuccinimide（同仁化学研究所社製）水溶液と1-Ethyl-3-[3-dimethylamino]propyl carbodiimide hydrochloride（同仁化学研究所社製）水溶液を同様にスポッタにて反応領域に滴下する。これにより、構造体表面にスクシンイミド基が露出される。さらに、ストレプトアビジンを結合させることにより、構造体表面がストレプトアビジンで修飾される。この構造体にビオチン化した抗AFP抗体を固定させる。

#### 【0081】

複数の検出素子のパターン領域を支持体上に作製し、それぞれに異なる抗体を固定させ、検体中の異なる標的物質を同一基板上にて検出するような構成をとることも可能である。異なる抗体を用いて、前記の方法と同様の固定化操作を行うことでこの構成を得ることができる。

#### 【0082】

以下の操作により、特異的に検体中のAFP濃度を測定することができる。

- （1）作製した素子に標的物質であるAFPを含んだ検体をインレット8より導入し、AFPを構造体上に捕捉させる。
- （2）検体を排出し、リン酸緩衝液をインレット8より導入し、反応ウェル7内部を洗浄する。
- （3）最後にリン酸緩衝液を充填して、金の構造体の吸収スペクトルを測定する。

#### 【0083】

吸収スペクトルについて反応前と反応後と比較すると、図13に1例を示すように、特異的な抗原抗体反応によって標的物質が検出素子表面に結合することで吸収スペクトルがシフトする。ここで、吸収スペクトルのピーク強度、あるいはピーク波長のシフト量とAFP濃度の相関は、あらかじめ既知のAFPコントロール溶液により求められており、濃度未知の検体の微量AFP濃度を求めることができる。

#### 【0084】

##### （実施例2）

図14に本実施例で用いた概略の構造を示す。検出素子は、膜厚20nmの金薄膜を625 $\mu$ m厚の石英板上に設け、これを電子線描画装置を用いてパターンニングすることで作製した。走査型電子顕微鏡（SEM）画像で確認すると、構造体の外形は150nm $\times$ 150nm、線幅は50nmである。描画プロセスの解像性の高低により、交差部の形状は

、必ずしも直角に作製できるとは限らない。構造体と構造体の間は、400 nmのスペースを開けてアレイ状に3 mm×3 mmの領域に配置されている。

構造体の表面に捕捉能を付与するため、本実施例で用いる標的物質捕捉体である抗AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) 抗体を金の構造体表面に固定する方法を示す。本実施例の構造体の材質である金と親和性の高いチオール基を持つ、11-Mercaptoundecanoic acidのエタノール溶液をスポッタ等で素子上に滴下し、前記構造体表面を修飾する。これにより、構造体表面にカルボキシル基が露出される。その状態で、N-Hydroxysulfosuccinimide (同仁化学研究所社製) 水溶液と1-Ethyl-3-[3-dimethylamino]propyl]carbodiimide hydrochloride (同仁化学研究所社製) 水溶液を同様にスポッタにて反応領域に滴下する。これにより、構造体表面にスクシンイミド基が露出される。さらに、ストレプトアビジンを結合させることにより、構造体表面がストレプトアビジンで修飾される。この構造体にビオチン化した抗AFP抗体を固定させる。

#### 【0085】

複数の検出素子のパターン領域を支持体上に作製し、それぞれに異なる抗体を固定させ、検体中の異なる標的物質を同一基板上にて検出するような構成をとることも可能である。異なる抗体を用いて、前記の方法と同様の固定化操作を行うことでこの構成を得ることができる。

#### 【0086】

以下の操作により、特異的に検体中のAFP濃度を測定することができる。

(1) 作製した素子に標的物質であるAFPを含んだ検体をインレット8より導入し、AFPを構造体上に捕捉させる。

(2) 検体を排出し、リン酸緩衝液をインレット8より導入し、反応ウェル7内部を洗浄する。

(3) 最後にリン酸緩衝液を充填して、金の構造体の吸収スペクトルを測定する。

#### 【0087】

吸収スペクトルについて反応前と反応後と比較すると、図15に1例を示すように、特異的な抗原抗体反応によって標的物質が検出素子表面に結合することで吸収スペクトルがシフトする。ここで、吸収スペクトルのピーク強度、あるいはピーク波長のシフト量とAFP濃度の相関は、あらかじめ既知のAFPコントロール溶液により求められており、濃度未知の検体の微量AFP濃度を求めることができる。

#### 【0088】

(実施例3及び比較例1)

本実施例では、素子の構成を変えた以外は、実施例1と同様の構成の検出装置を用いた。本実施例で用いた検出素子は、膜厚20 nmの金薄膜を625  $\mu$ m厚の石英板上に形成し、これを電子線描画装置を用いてパターンニングして製作した。図16の走査型電子顕微鏡(SEM)画像にあるように、金属構造体の平面形状の外形は200 nm×200 nm、リングの帯幅は50 nmである。解像性の高低により、内側の開口部の形状は、外形とは必ずしも同じに作製できるとは限らない。構造体と構造体の間は、250 nmのスペースを開けてアレイ状に3 mm×3 mmの領域に配置されている。本実施例の金属構造体の吸収スペクトルは、大気中で1070 nm近傍にピーク波長を持っている。図17に基本性能としての屈折率に対する応答性を示した。屈折率に対するこのピーク波長のシフトの大きさは、リング状の周回構造を持たない同一外周形状及び同サイズのパターン(比較例1)と比較すると、1.4倍程度増加した。

#### 【0089】

構造体の表面に捕捉能を付与するため、本実施例で用いる標的物質捕捉体である抗AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) 抗体を金の構造体表面に固定する方法を示す。本実施例の構造体の材質である金と親和性の高いチオール基を持つ、11-Mercaptoundecanoic acidのエタノール溶液をスポッタ等で素子上に滴下し、前記構造体表面を修飾する。これにより、構造体表面にカルボキシル基が露出される。その状態

で、N-Hydroxysulfosuccinimide（同仁化学研究所社製）水溶液と1-Ethyl-3-[3-dimethylamino]propyl]carbodiimide hydrochloride（同仁化学研究所社製）水溶液を同様にスポッタにて反応領域に滴下する。これにより、構造体表面にスクシンイミド基が露出される。さらに、ストレプトアビジンを結合させることにより、構造体表面がストレプトアビジンで修飾される。この構造体にビオチン化した抗AFP抗体を固定させる。

#### 【0090】

複数の検出素子のパターン領域を支持体上に作製し、それぞれに異なる抗体を固定させ、検体中の異なる標的物質を同一基板上にて検出するような構成をとることも可能である。異なる抗体を用いて、前記の方法と同様の固定化操作を行うことでこの構成を得ることができる。

#### 【0091】

実施例1と同様の操作により、特異的に検体中のAFP濃度を測定することができる。

#### 【0092】

吸収スペクトルの変化について反応前と反応後と比較すると、特異的な抗原抗体反応によって、標的物質が検出素子表面に結合することで実施例と同様の吸収スペクトルのシフトが観察された。ここで、吸収スペクトルのピーク強度、あるいはピーク波長のシフト量とAFP濃度の相関は、あらかじめ既知のAFPコントロール溶液により求められており、濃度未知の検体の微量AFP濃度を求めることができる。

#### 【0093】

（実施例4）

図23に本実施例で用いる検出装置の概略の構造を示す。検出素子は、膜厚20nmの金薄膜を625 $\mu$ m厚の石英板上に形成し、これを所定のパターンに電子線描画装置を用いてパターンニングすることで製作する。開口部の平面形状の外形は200nm $\times$ 200nmの十字型形状、帯幅は50nmである。解像性の高低により、内側の開口部の形状は、外形とは必ずしも同じに作製できるとは限らない。各開口部は、400nmのスペースを開けてアレイ状に3mm $\times$ 3mmの領域に配置されている。

#### 【0094】

次に、金属膜の表面に捕捉能を付与するため、本実施例で用いる標的物質捕捉体である抗AFP（ $\alpha$ -fetoprotein）抗体を金の膜表面に固定する方法を示す。本実施例の膜の材質である金と親和性の高いチオール基を持つ、11-Mercaptoundecanoic acidのエタノール溶液をスポッタ等で素子上に滴下し、前記膜表面を修飾する。これにより、膜表面にカルボキシル基が露出される。その状態で、N-Hydroxysulfosuccinimide（同仁化学研究所社製）水溶液と1-Ethyl-3-[3-dimethylamino]propyl]carbodiimide hydrochloride（同仁化学研究所社製）水溶液を同様にスポッタにて反応領域に滴下する。これにより、膜表面にスクシンイミド基が露出される。さらに、ストレプトアビジンを結合させることにより、金属膜表面がストレプトアビジンで修飾される。この金属膜にビオチン化した抗AFP抗体を固定させる。

#### 【0095】

複数の検出素子のパターン領域を基板上に作製し、それぞれに異なる抗体を固定させ、検体中の異なる標的物質を同一基板上にて検出するような構成をとることも可能である。異なる抗体を用いて、前記の方法と同様の固定化操作を行うことでこの構成を得ることができる。

#### 【0096】

以下の操作により、特異的に検体中のAFP濃度を測定することができる。光源ユニット12及び分光光度計13は、入力ユニット19より操作を入力し、HDD上に保存してあるプログラムをRAM21にロードして実行し、表示ユニット15に結果を表示させる。

（1）インレット8を送液ポンプ10に、アウトレット9を廃液リザーバ16に接続し、光源ユニット12と分光光度計13の間に反応ウェル7が来るように検出チップ22を設

置する。

(2) 標的物質であるAFPを含んだ検体を送液ポンプ10によりインレット8から導入し、反応ウェル7においてAFPを素子18上に捕捉させる。

(3) 検体をアウトレット9より排出し、リン酸緩衝液をインレット8より導入し、反応ウェル7内部を洗浄する。排出した液は廃液リザーバ16に貯める。

(4) 最後にリン酸緩衝液を反応ウェル7に充填して、光源ユニット12よりタンクステンランプの光を反応ウェル7中にある素子18に透過させ、分光光度計13を用いて吸収スペクトルを測定する。

#### 【0097】

吸収スペクトルについて反応前と反応後と比較すると、図15に示すものと同様の結果が得られる。すなわち、特異的な抗原体反応によって標的物質が検出素子表面に結合することで吸収スペクトルがシフトする。ここで、吸収スペクトルのピーク強度、あるいはピーク波長のシフト量とAFP濃度の相関は、あらかじめ既知のAFPコントロール溶液により求められており、濃度未知の検体の微量AFP濃度を求めることができる。

#### 【0098】

##### 実施例5

図30及び図31に本実施例で用いる検出装置の概略の構造を示す。検出素子は、膜厚20nmの金薄膜を625 $\mu$ m厚の石英板上に形成し、これを所定のパターンに電子線描画装置を用いてパターンニングすることで製作する。複合金属構造体のパターンは、400nmの開口部を持つ膜からなる小金属構造体と、各小金属構造体開口部の中心に配置された100nmの正方形の微小金属構造体からなるパターンである。解像性の高低により、内側の開口部の形状は、外形とは必ずしも同じに作製できるとは限らない。各開口部は、400nmのスペースを開けてアレイ状に3mm $\times$ 3mmの領域に配置されている。

#### 【0099】

次に、複合金属構造体の表面に捕捉能を付与するため、本実施例で用いる標的物質捕捉体である抗AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) 抗体を金の表面に固定する方法を示す。本実施例の構造体の材質である金と親和性の高いチオール基を持つ、11-Mercapto undecanoic acidのエタノール溶液をスポッタ等で素子上に滴下し、前記金表面を修飾する。これにより、金表面にカルボキシル基が露出される。その状態で、N-Hydroxysulfosuccinimide (同仁化学研究所社製) 水溶液と1-Ethyl-3-[3-dimethylamino]propyl carbodiimide hydrochloride (同仁化学研究所社製) 水溶液を同様にスポッタにて反応領域に滴下する。これにより、金表面にスクシンイミド基が露出される。さらに、ストレプトアビジンを結合させることにより、金表面がストレプトアビジンで修飾される。この金にビオチン化した抗AFP抗体を固定させる。

#### 【0100】

複数の検出素子のパターン領域を基板上に作製し、それぞれに異なる抗体を固定させ、検体中の異なる標的物質を同一基板上にて検出するような構成をとることも可能である。異なる抗体を用いて、前記の方法と同様の固定化操作を行うことでこの構成を得ることができる。

#### 【0101】

実施例4と同様にして特異的に検体中のAFP濃度を測定することができる。

#### 【0102】

吸収スペクトルについて反応前と反応後と比較すると、図15に示すものと同様の結果を得ることができる。すなわち、特異的な抗原体反応によって標的物質が検出素子表面に結合することで吸収スペクトルがシフトする。ここで、吸収スペクトルのピーク強度、あるいはピーク波長のシフト量とAFP濃度の相関は、あらかじめ既知のAFPコントロール溶液により求められており、濃度未知の検体の微量AFP濃度を求めることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0103】

【図 1】 本発明の実施の形態における金属構造体の各種平面形状を例示する模式図である。

【図 2】 本発明の実施の形態における金属構造体の各種平面形状の例示する模式図である。

【図 3】 本発明の実施の形態における検出素子の一例を示す模式図である。

【図 4】 本発明の実施の形態における検出素子の一例を示す模式図である。

【図 5】 本発明の実施の形態における検出素子の作製方法を説明する図である。

【図 6】 本発明の実施の形態における検出素子の作製方法を説明する図である。

【図 7】 本発明の実施の形態における検出素子の作製方法を説明する図である。

【図 8】 本発明の実施の形態における検出素子上の捕捉体の例を示す模式図である。

【図 9】 本発明の実施の形態における検出装置の一例を表す模式図である。

【図 10】 本発明の実施の形態における検出装置のブロック図である。

【図 11】 実施例 1 及び 3 の検出装置の模式図である。

【図 12】 実施例 1 の検出素子の SEM 画像の 1 例である。

【図 13】 実施例 1 の検出スペクトル（吸収スペクトル）の変化の一例である。

【図 14】 実施例 2 の検出装置の模式図である。

【図 15】 実施例 2 の検出スペクトル（吸収スペクトル）の変化の一例である。

【図 16】 実施例 3 の検出素子の SEM 画像の一例である。

【図 17】 実施例 3 で得られた検出素子における吸収スペクトルを示す図である。

【図 18】 金属構造体の平面パターンの大きさの測定基準を示す図である。

【図 19】 本発明の実施の形態における金属膜開口部の各種平面形状の例示する模式図である。

【図 20】 本発明の実施の形態における検出素子の一例を示す模式図である。

【図 21】 本発明の実施の形態における検出素子の作製方法を説明する図である。

【図 22】 本発明の実施の形態における検出素子上の捕捉体の例を示す模式図である。

【図 23】 実施例 4 の検出装置の模式図である。

【図 24】 本発明の実施の形態における小金属構造体の外形の各種平面形状の例示する模式図である。

【図 25】 金属膜開口部の平面パターンの大きさの測定基準を示す図である。

【図 26】 本発明の実施の形態における小金属構造体の開口部の各種平面形状の例示する模式図である。

【図 27】 本発明の実施の形態における微小金属構造体の外形の各種平面形状の例示する模式図である。

【図 28】 本発明の実施の形態における複合金属構造体の各種平面形状の例示する模式図である。

【図 29】 本発明の実施の形態における小金属構造体開口空間内に微小金属構造体が存在することを例示する模式図である。

【図 30】 本発明の実施の形態における検出素子の一例を示す模式図である。

【図 31】 実施例 1 の検出装置の模式図である。

【図 32】 本発明の実施の形態における検出素子の作製方法を説明する図である。

#### 【符号の説明】

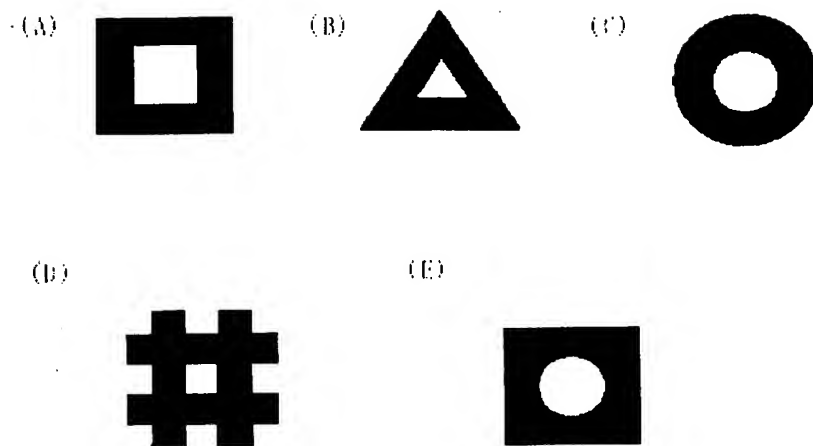
##### 【0104】

- 1 金属構造体の支持体（基板）
- 2 金属薄膜
- 3 電子線レジスト
- 4 金属構造体
- 5 抗体
- 6 標的物質（検出対象物質）
- 7 反応ウエル

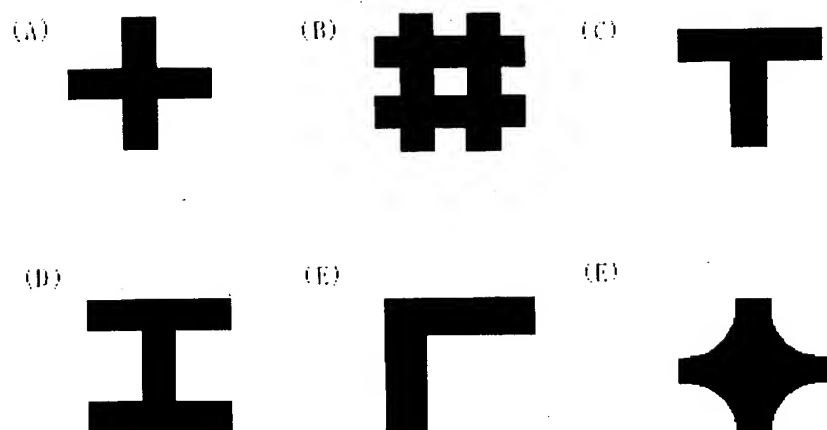
- 8      インレット
- 9      アウトレット
- 10     送液ポンプ
- 11     流路
- 12     光源ユニット
- 13     分光光度計
- 14     中央演算装置
- 15     表示ユニット
- 16     廃液リザーバ
- 17     コリメートレンズ
- 18     素子
- 19     入力ユニット
- 20     HDD
- 21     RAM
- 22     検出チップ
- 23     基板（検出チップの支持体）
- 24     金属膜開口部

【書類名】 図面

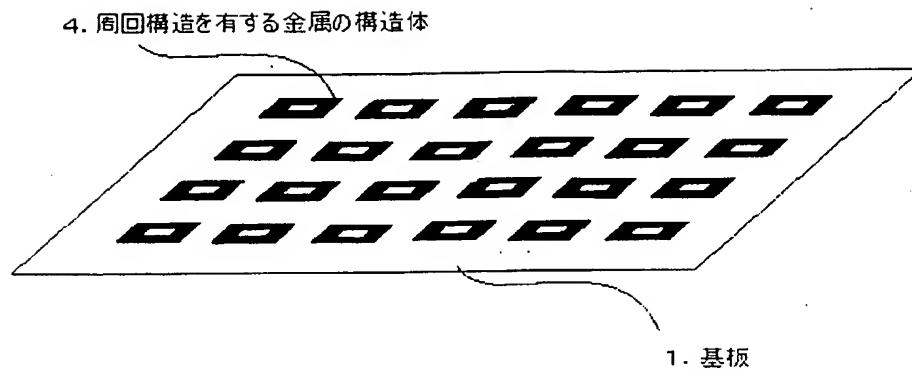
【図 1】



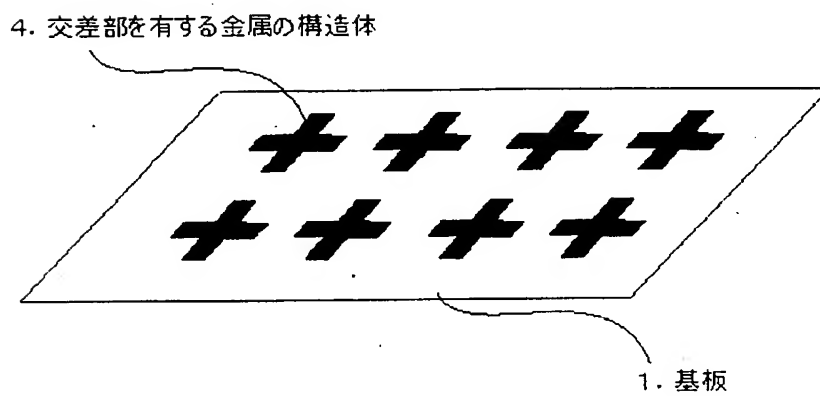
【図 2】



【図 3】

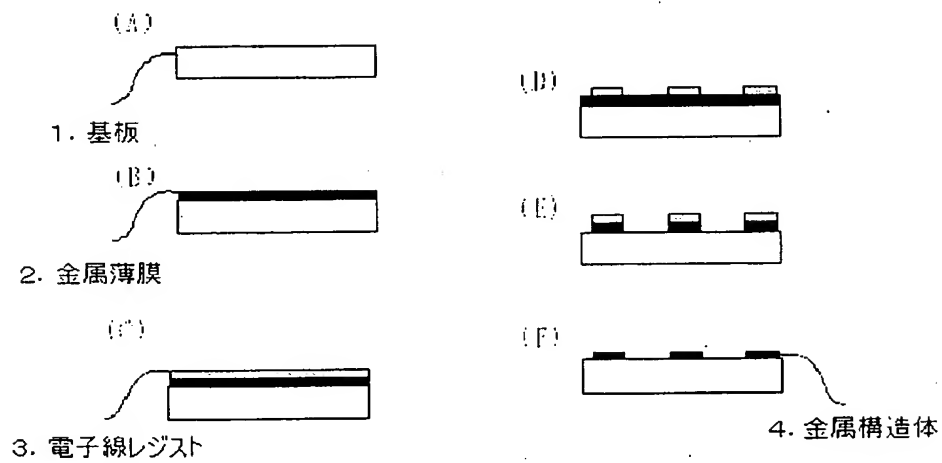


【図 4】

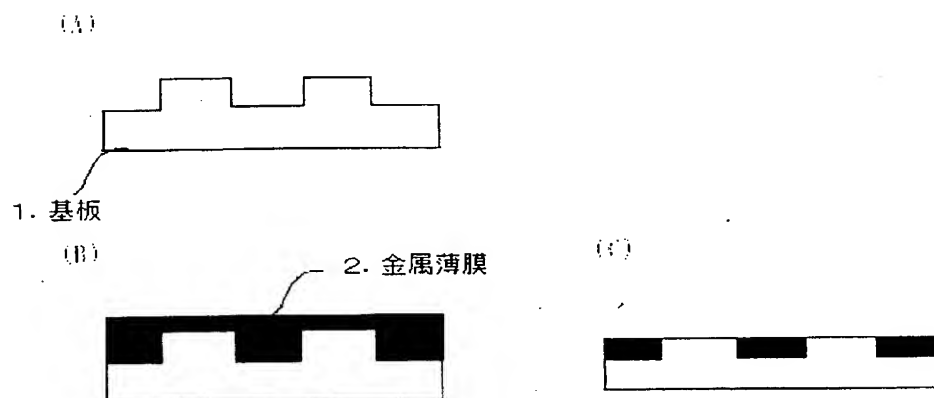




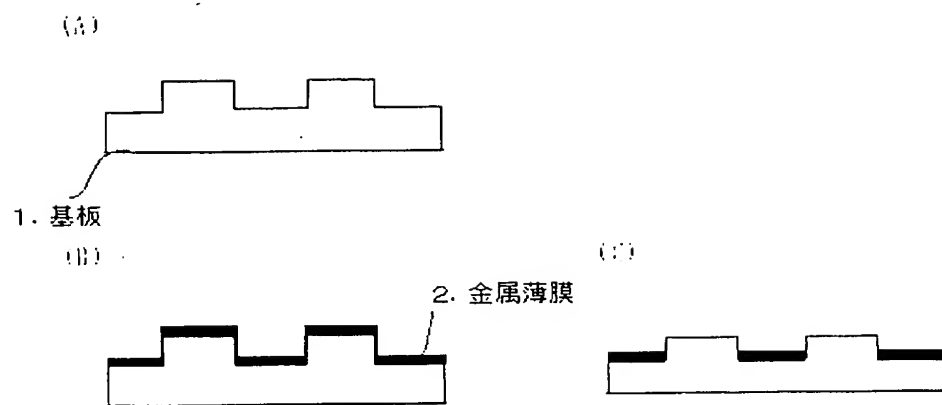
【図 5】



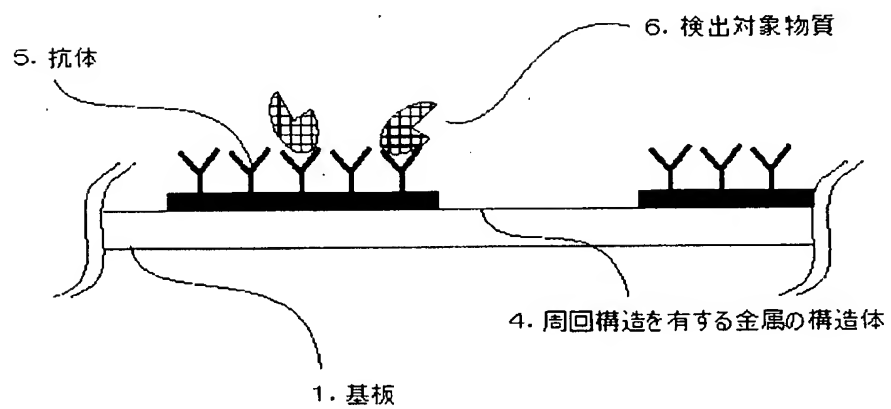
【図 6】



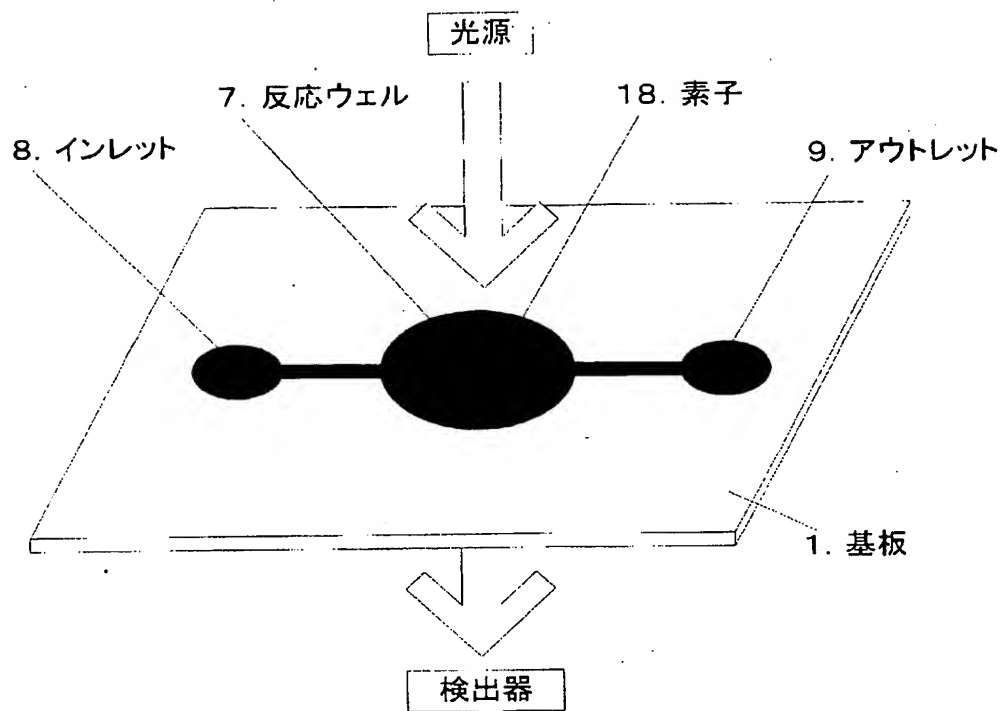
【図 7】



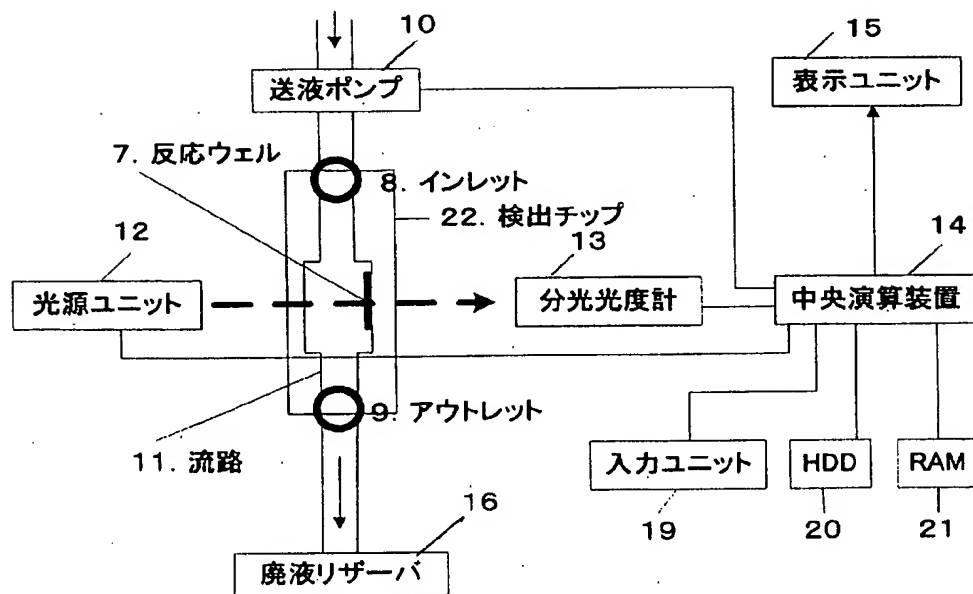
【図 8】



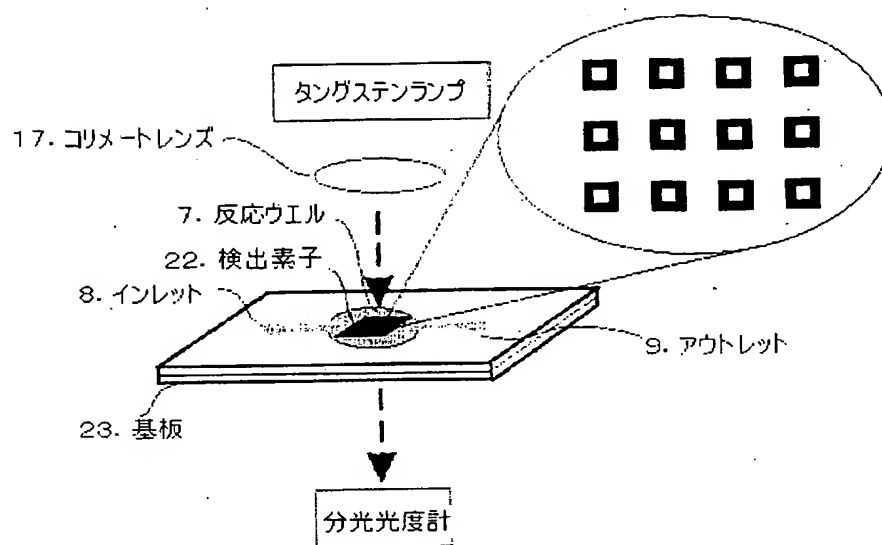
【図 9】



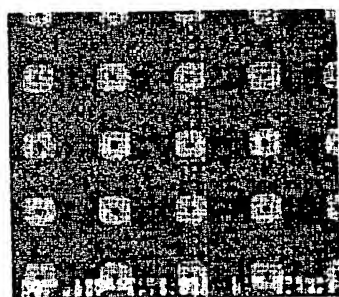
【図 10】



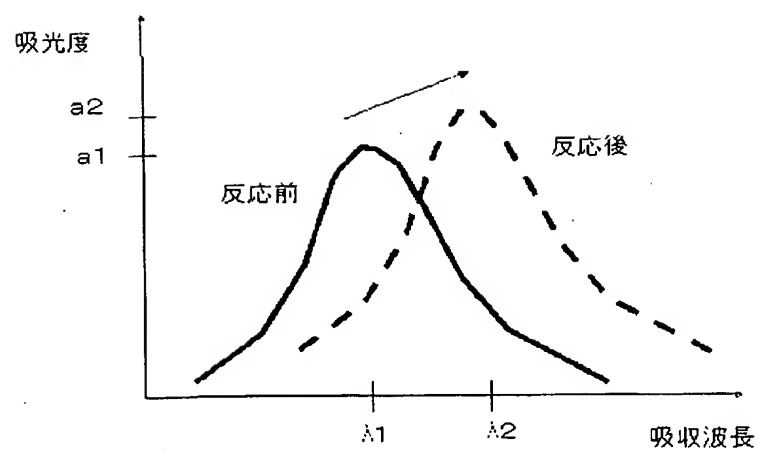
【図 1 1】



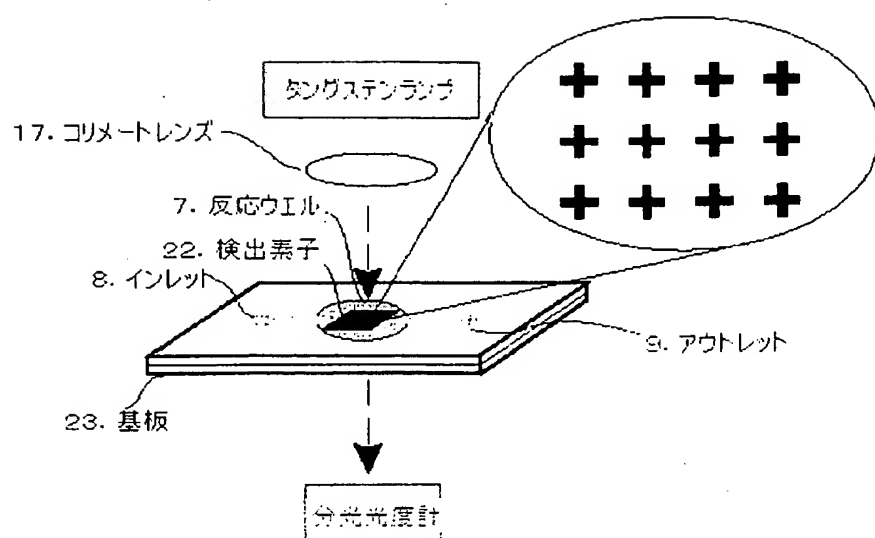
【図 1 2】



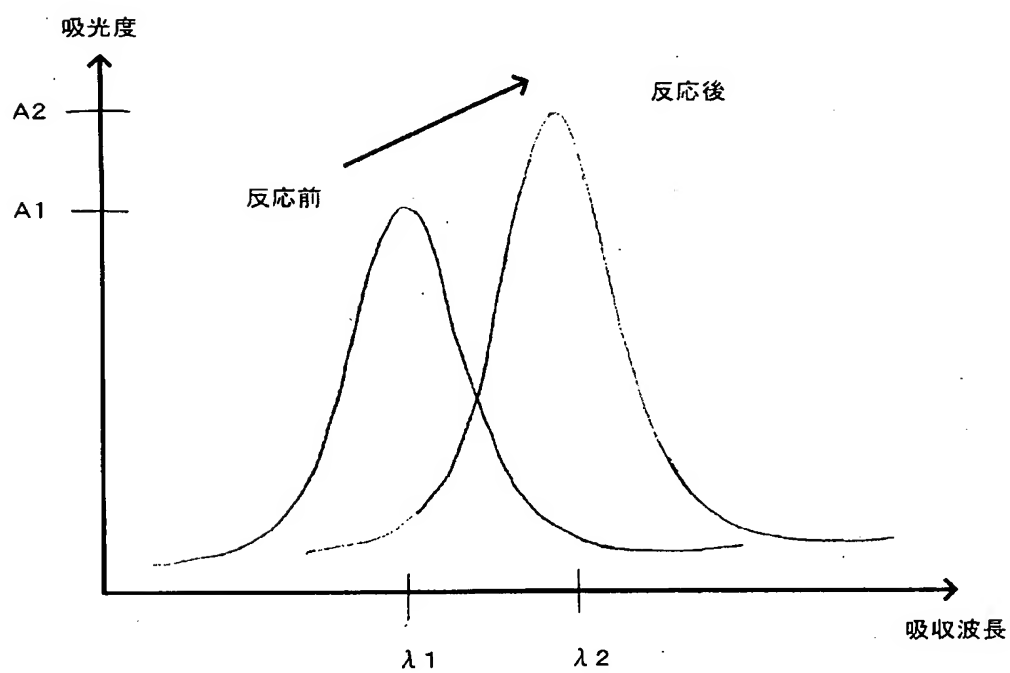
【図 1 3】



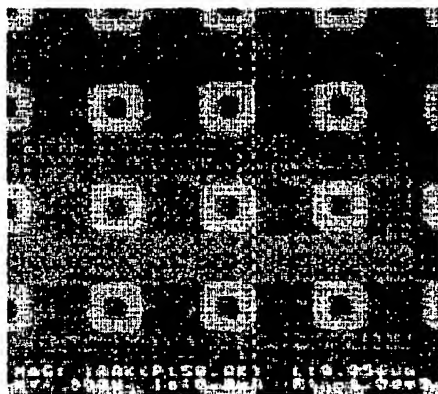
【図 1 4】



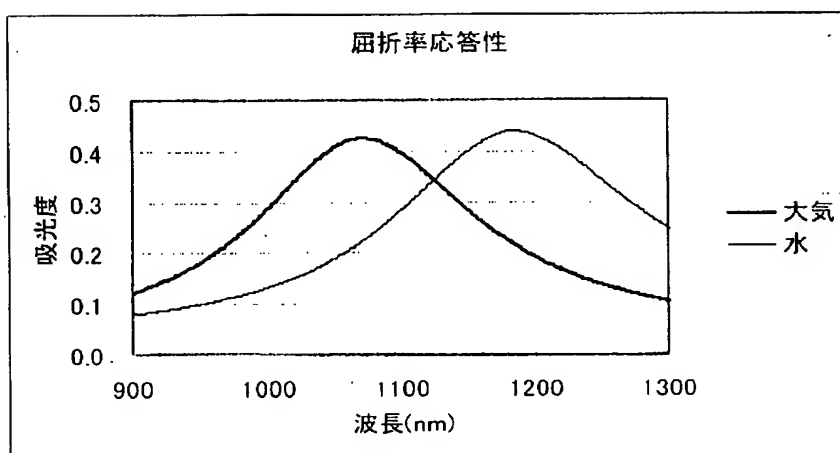
【図 1 5】



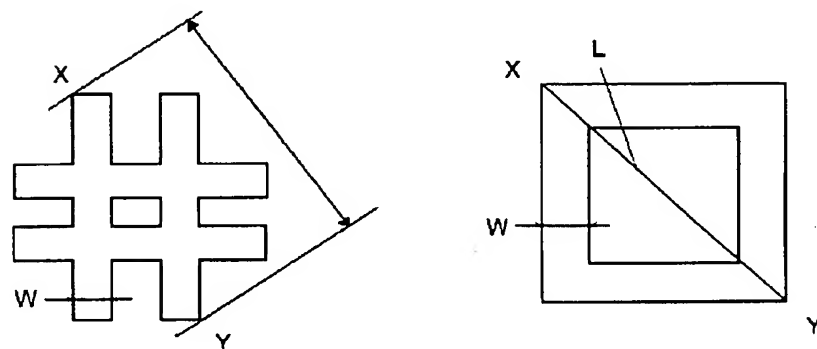
【図 1 6】



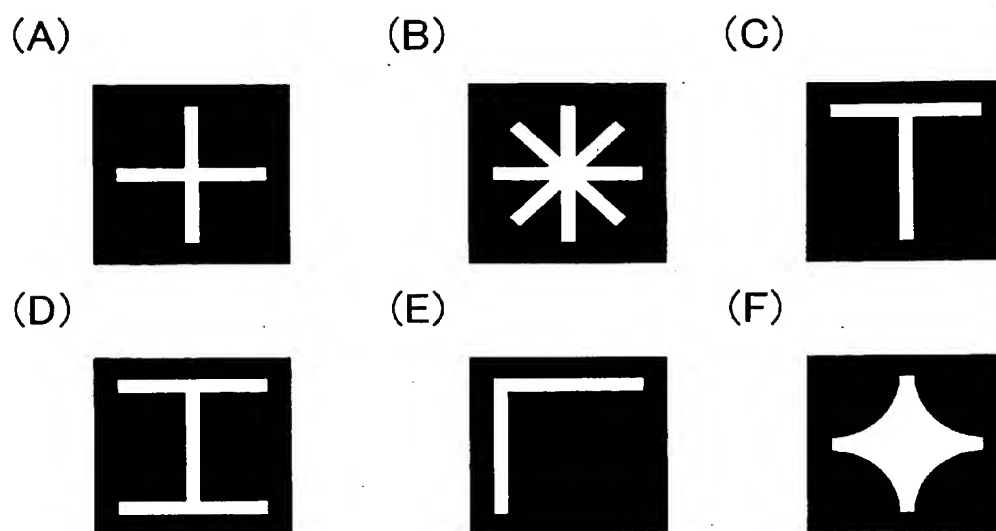
【図 1 7】



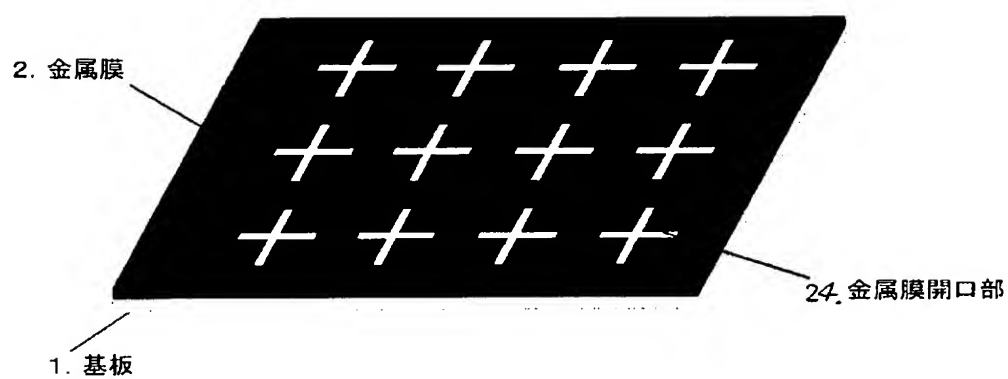
【図 1 8】



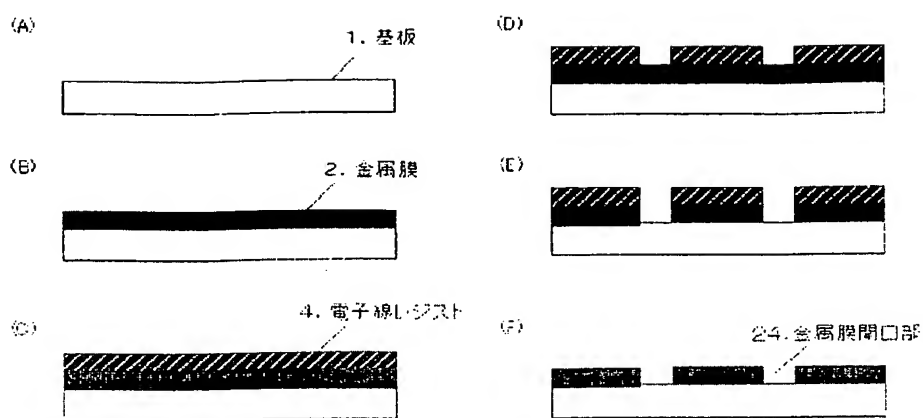
【图 1 9】



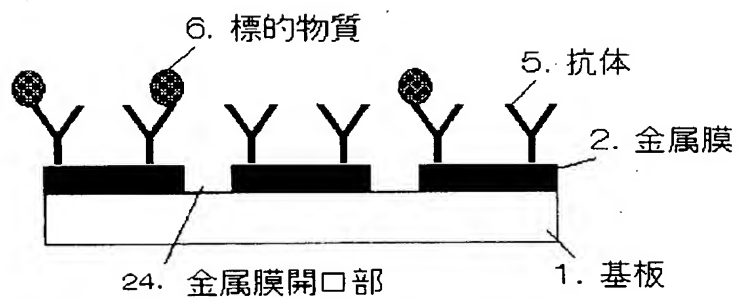
【图 2 0】



【図 2 1】

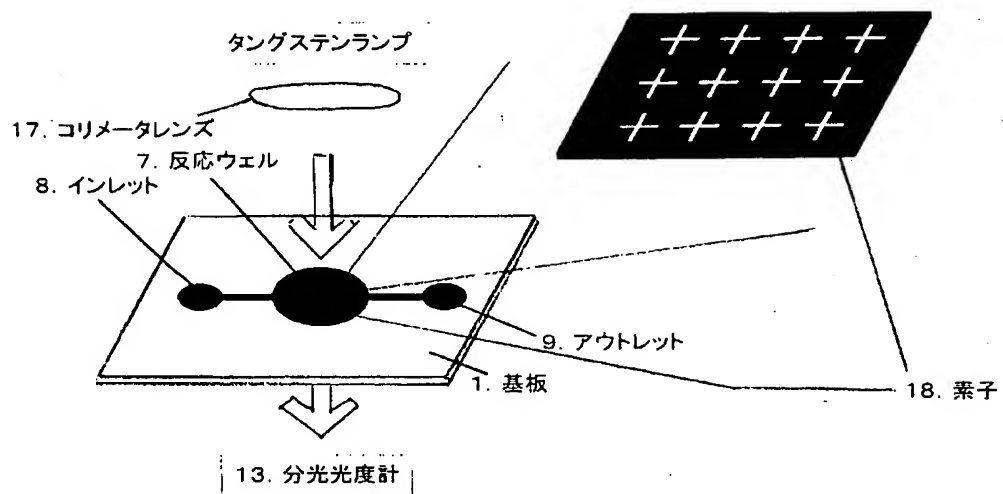


【図 2 2】

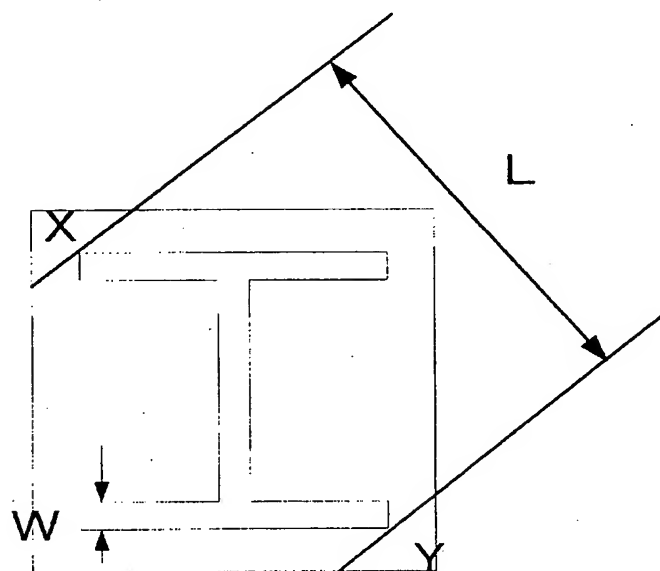




【図 2 3】

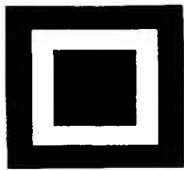


【図 2 4】

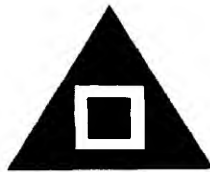


【图 2 5】

(A)



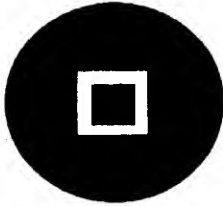
(B)



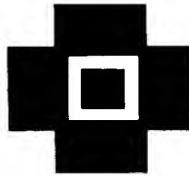
(C)



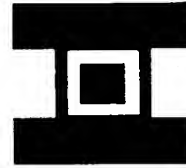
(D)



(E)

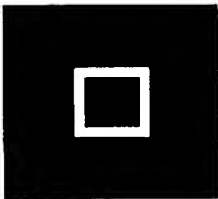


(F)

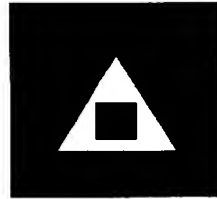


【图 2 6】

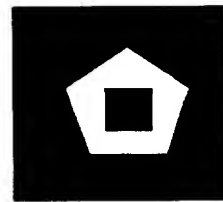
(A)



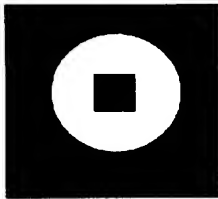
(B)



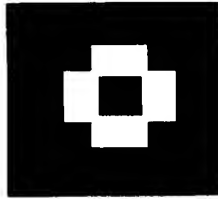
(C)



(D)



(E)

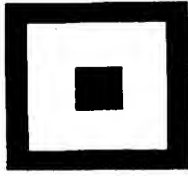


(F)

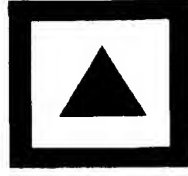


【图 2 7】

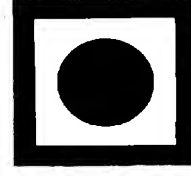
(A)



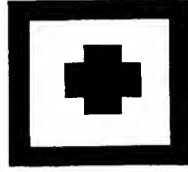
(B)



(C)



(D)



(E)

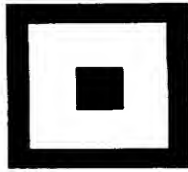


(F)

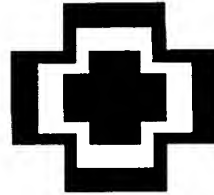


【图 2 8】

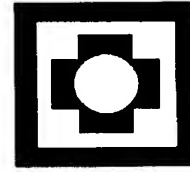
(A)



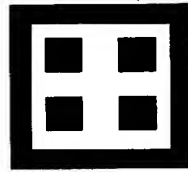
(B)



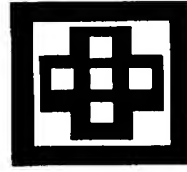
(C)



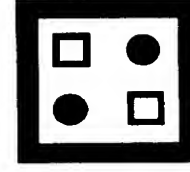
(D)



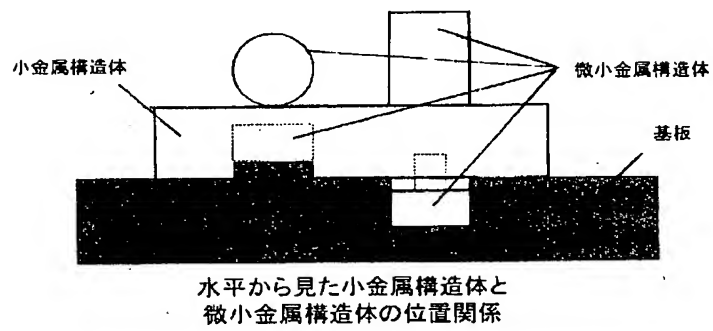
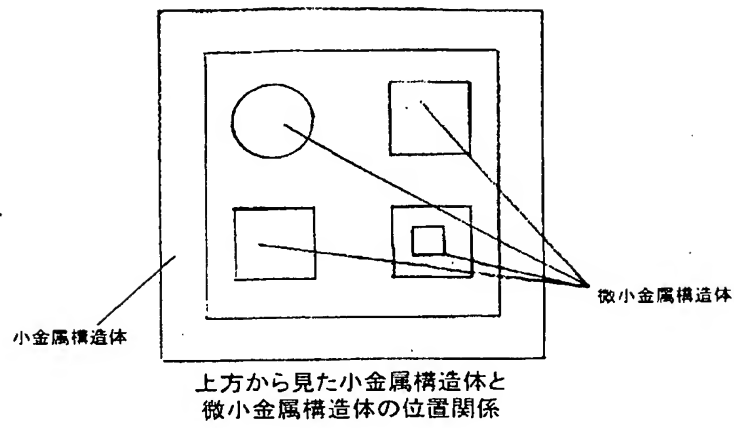
(E)



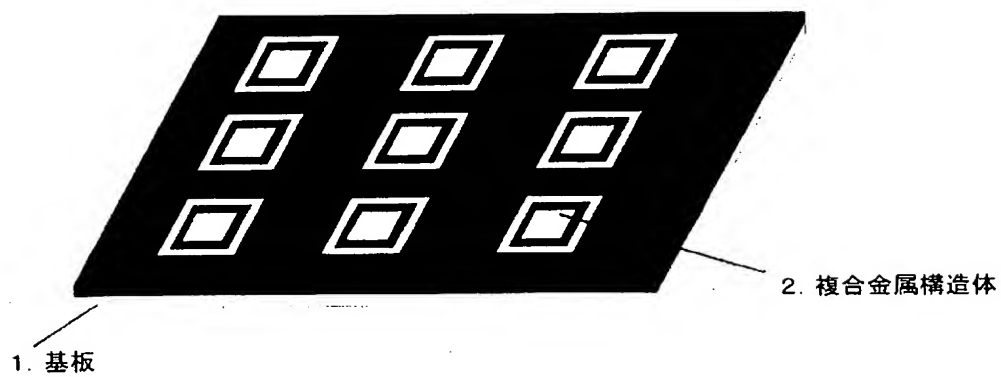
(F)

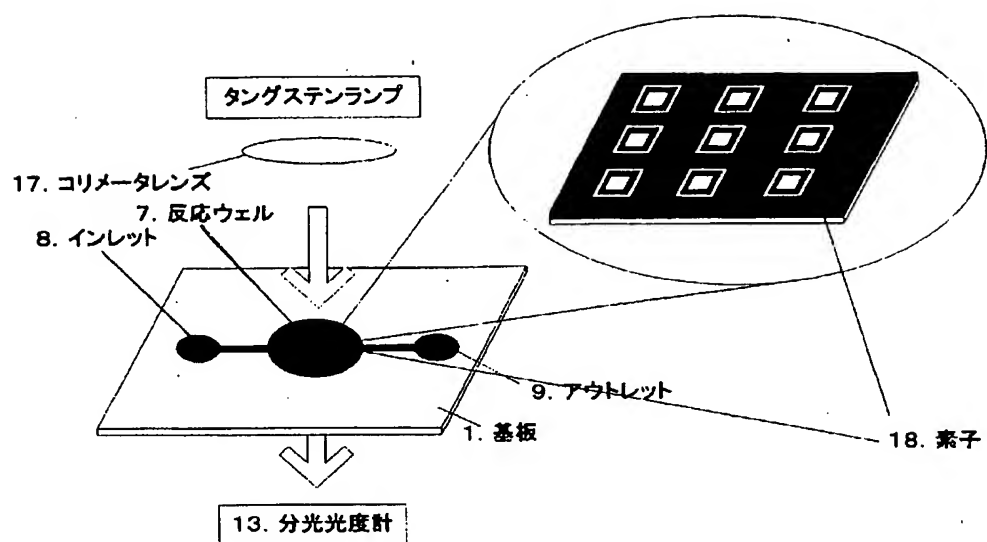


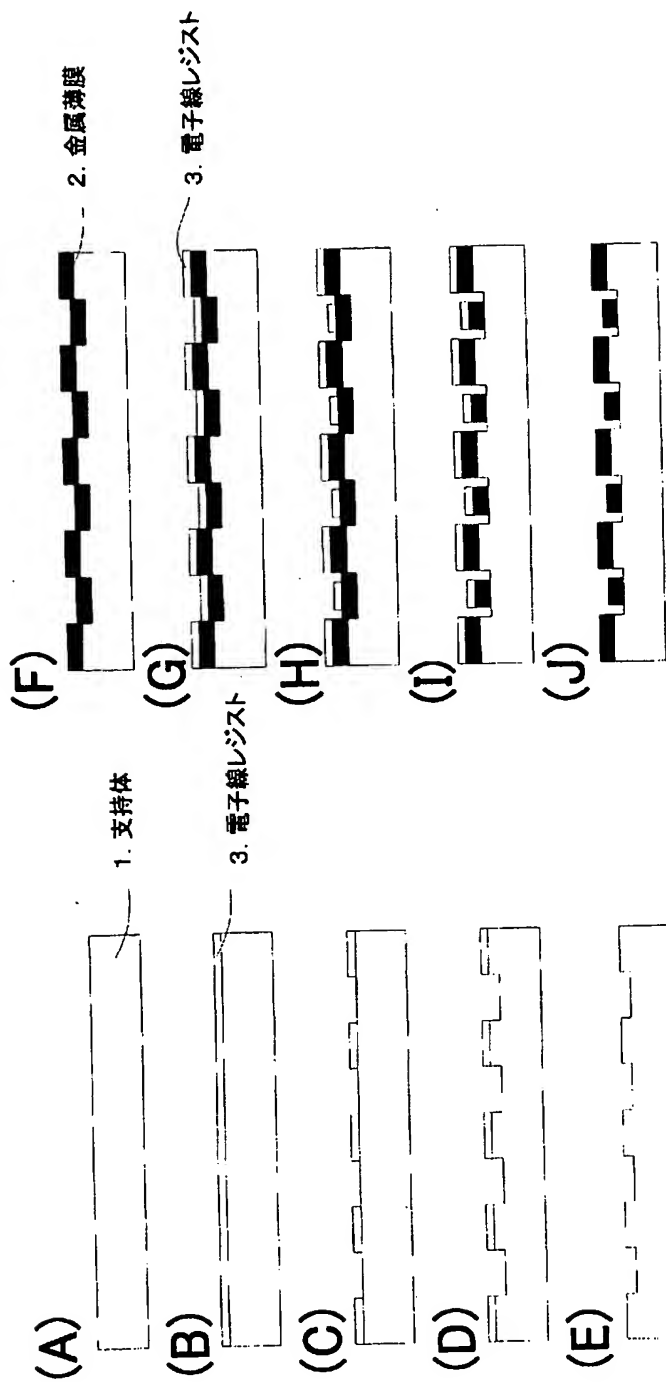
【図 29】



【図 30】







【書類名】要約書

【要約】

【課題】局在プラズモン共鳴を利用した標的物質の検出における検出感度を向上させることのできる構成を有する標的物質検出用素子、それを用いた標的物質の検出方法、そのための装置及びキットを提供することにある。

【解決手段】局在プラズモン共鳴を利用した標的物質の検出における標的物質を捕捉するための標的物質検出用素子として、ループ部及び／または分岐部を有する平面パターンとして形成された金属構造体を基板上に設けた構成のものを用いる。

【選択図】図2

出願人履歴

000001007

19900830

新規登録

595017850

東京都大田区下丸子3丁目30番2号  
キャノン株式会社